饲粮维生素 D 添加形式对公猪繁殖性能的影响

魏冬芹[1]　董洪俊[1]　吕　刚[2]　吴　德[1]　徐盛玉[1]　方正锋[1]　车炼强[1]　冯　斌[1]　李　健[1]　林　燕[1]

（1.四川农业大学动物营养研究所，成都 611130；2.通威集团有限公司，成都 610041）

摘　要：本试验旨在研究饲粮维生素 D 添加形式对种用公猪繁殖性能的影响。选取 16 头 18 月龄的约克公猪，随机分成 2 组，分别在基础饲粮中添加 50 μg/kg 维生素 D_3（VD_3）和 25-羟基维生素 D_3（25-OHD_3），每组 8 个重复，每个重复 1 头猪。试验期 16 周。结果表明，与 VD_3 组相比：1～16 周，25-OHD_3 组公猪精子活力和每次射精的有效精子数显著提高（P<0.05），而精子畸形率显著降低（P<0.05）；第 112 天，25-OHD_3 组血浆钙离子（Ca^{2+}）和雌二醇含量及芳香化酶活性显著提高（P<0.05），精清 25-OHD_3、Ca^{2+}、果糖含量和酸性磷酸酶的活性显著提高（P<0.05）；25-OHD_3 组芳香化酶、维生素 D 25-羟化酶、维生素 D 24-羟化酶和维生素 D 受体基因的表达量显著升高（P<0.05）。综上所述，与同等水平 VD_3 相比，种公猪饲粮中添加 25-OHD_3 能更有效增加血浆维生素 D 含量，从而改善精子的形态和运动能力，提高公猪的繁殖性能。

关键词：维生素 D_3；25-羟基维生素 D_3；公猪；繁殖性能

中图分类号：S828

随着我国现代化养猪业的发展，提高公猪繁殖性能对现代化养猪业显得极其重要。研究表明，影响公猪繁殖性能的因素很多，包括遗传或内在因素，如品种[1]、年龄[2]和睾丸大小[3]；外在的环境因素，如温度和光照[4-5]；饲养因素，如精液采集频率、营养和社会环境[6]。然而现今规模化、集约化程度的大幅提高，环境条件和管理水平相对一致，所以营养的供给将直接影响到公猪繁殖潜力的发挥。维生素 D_3（vitamin D_3，VD_3）是动物机体的一种重要脂溶性维生素，Kwiecinski 等[7]研究发现用 VD_3 缺乏的雄性大鼠精液进行人工授精，雌性大鼠的受孕率比 VD_3 充足的低 71%。VD_3 在肝脏中的代谢产物为 25-羟基维生素 D_3（25-hydroxycholecalciferol,25-OHD_3），是具有最大生物活性的 VD_3 代谢产物[8]。Coffey 等[9]

收稿日期：2017-05-18
基金项目：畜禽繁殖调控新技术研发（2017YFD0501900）
作者简介：魏冬芹（1995—），重庆人，本科生，动物营养与饲养科学专业。E-mail: weidongqin2013@163.com
*同等贡献作者

和 Hines 等[10]在母猪饲粮中分别添加 2 500 IU/kg VD_3 和 500 IU/kg VD_3+50 μg/kg 25-OHD_3，发现添加 500 IU/kg VD_3+50 μg/kg 25-OHD_3 产仔数得到提高，母猪骨骼状态得到改善。Zhou 等[11]在母猪饲粮中添加 2 000 IU/kg 的 25-OHD_3 时，发现 25-OHD_3 可以改善后备母猪繁殖成绩及后代肌肉品质。然而目前有关维生素 D 在公猪上的研究资料较少。Audet 等[12]在公猪上的研究表明，相比于每日提供 3×10^6 IU 的 VD_3 饲粮时，每日提供 10×10^6 IU 的 VD_3 饲粮增加了血液维生素水平，并有效改善精液质量。对于公猪饲粮维生素 D 添加形式对公猪繁殖性能的研究更是尚未见报道，有待进一步研究。因此，本研究分别在公猪饲粮中添加 2 000 IU/kg VD_3 和 2 000 IU/kg 的 25-OHD_3，从而考察维生素 D 不同形式对公猪繁殖性能的影响，旨在为 VD_3 在种用公猪饲养中的应用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验动物与试验设计

选择（18.0±0.5）月龄的种用约克公猪 16 头，根据精液量和睾丸大小分为 2 组，每组 8 个重复，每个重复 1 头猪。分别在基础饲粮中添加 50 μg/kg 的 VD_3（即 2 000 IU/kg，VD_3 组）和 25-OHD_3（即 2 000 IU/kg，25-OHD_3 组）。

1.2　试验饲粮

基础饲粮参照 NRC（2012）成年种公猪营养需要进行配制，试验饲粮在基础饲粮中分别添加 VD_3 和 25-OHD_3，其组成及营养水平见表 1。参考《中国饲料成分及营养价值表（2013）》（第 24 版）中原料营养水平计算饲粮营养水平。试验所用 VD_3 和 25-OHD_3 购自四川民生药业有限公司。VD_3 和 25-OHD_3 在 4 ℃保存直至试验结束，每次配制的饲粮饲喂不超过 3 周，饲粮避光干燥保存。

表 1　试验饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of experimental diets (air-dry basis)　%

项目 Items	组别 Groups	
	VD_3	25-OHD_3
原料 Ingredients		
玉米 Corn	61.26	61.54
麦麸 Wheat bran	10.40	10.40
豆粕 Soybean meal（44%）	21.00	21.00
豆油 Soybean oil	2.50	2.50
L-赖氨酸盐酸盐 *L*-Lys•HCl（98.5%）	0.61	0.61
L-色氨酸 *L*-Trp（98%）	0.08	0.08

维生素 D_3 VD_3	0.32	
25-羟基维生素 D_3 25-OHD_3		0.04
石粉 Limestone	0.75	0.75
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	2.20	2.20
氯化胆碱 Choline chloride（50%）	0.15	0.15
食盐 NaCl	0.50	0.50
维生素预混料 Vitamins premix[1)]	0.10	0.10
矿物质预混料 Minerals premix[2)]	0.13	0.13
合计 Total	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels[3)]		
消化能 DE/(MJ/kg)	13.77	13.77
粗蛋白质 CP	16.20	16.21
钙 Ca	0.79	0.79
有效磷 AP	0.51	0.51
总赖氨酸 TLys	1.08	1.08
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.31	0.31
维生素 D_3 VD_3/(μg/kg)	50.00	
25-羟基维生素 D_3 25-OHD_3/(μg/kg)		50.00

[1)]维生素预混料为每千克饲粮供 The vitamin premix provided the following per kg of diets：VA 4 000 IU，VK 5 mg，VE 25 IU，VB_1 2 mg，VB_2 16 mg，VB_6 6 mg，VB_{12} 0.03 mg，叶酸 folic acid 0.5 mg，生物素 biotin 0.033 mg，泛酸 pantothenate 25 mg，烟酸 niacin 35 mg。

[2)]矿物质预混料为每千克饲粮供 The mineral premix provided the following per kg of the diet：Cu 7.5 mg，Zn 65 mg，Fe 95 mg，Mn 30 mg，Se 0.3 mg，I 0.25 mg。

[3)]营养水平均为计算值。Nutrition levels were calculated values.

1.3 饲养管理

试验在四川省名山区种公猪站进行，试验前对场地进行熏蒸消毒，保证场地的卫生条件，室内温度保持在 15~25 ℃。试验期共为 112 d，采用限制饲养，每头猪每天饲喂 2.5 kg，每天饲喂 2 次，即 08:00 和 14:00 各喂 1 次。公猪单个饲养于面积为 5.29 m^2 的单栏中；保证猪只足够的饮水，每次饲喂后 0.5 h 内清粪打扫卫生，保持圈舍与猪体清洁，合理运动；采样时注意保护其四肢不受损伤；保证圈舍通风良好，夏季做好防暑降温；每周对圈舍及周围进行 2 次消毒并做好公猪正常的免疫。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 睾丸测量

试验第 1 天、第 56 天和第 112 天对每头猪左右 2 侧睾丸的长、宽分别进行测量并记录。

睾丸长：单侧睾丸纵向 2 顶点的最大长度。

睾丸宽：单侧睾丸横向顶点到纵隔的最大距离。

睾丸体积（cm^3）=0.523 6×睾丸长×睾丸宽^2。

1.4.2　性欲测定

试验种公猪严格按照徒手采精法采精，保持每周 2 次采精频率直至试验结束，用秒表记录种公猪射精反应时间和射精持续时间。

1.4.3　精液品质测定

试验每周采集 2 次精液样品，依据世界卫生组织提供的标准方法[13]检测公猪精液的胶体重量、精液量、精子密度、精子活力、精子畸形率、顶体完整率、质膜完整率。

1.4.4　血浆生化指标测定

试验第 1 天、第 56 天和第 112 天采集血液，测定血浆生化指标。血浆中 25-OHD_3、芳香化酶、睾酮及雌二醇含量采用酶联免疫吸附试验（ELISA）法测定，血浆钙离子（Ca^{2+}）含量测定采用甲基百里香酚蓝法，磷（P）含量测定采用磷钼酸法测定。所有血浆生化指标均采用试剂盒测定，芳香化酶、睾酮和雌二醇含量测定试剂盒购自美国 R&D Systems 公司，其他血液指标测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.4.5　精清生化指标测定

试验第 1 天、第 56 天和第 112 天采集精液，测定精清生化指标。精清 25-OHD_3 含量采用 ELISA 法测定，精浆 Ca^{2+}含量测定采用甲基百里香酚蓝法，P 含量测定采用磷钼酸法，果糖含量测定采用紫外分光光度法，酸性磷酸酶（acid phosphatase,ACP）活性测定采用磷酸苯二钠法，所有精清生化指标均采用试剂盒测定，试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.4.6　精子基因表达量测定

试验 112 天测定公猪精子基因表达量。精子中总 RNA 提取采用美国 Invitrogen 公司生产的 TRLzol® LS Reagent，提取后采用 2 步法进行逆转录聚合酶链式反应（RT-PCR），首先将总 RNA 反转录为 cDNA，接着对 cDNA 进行扩增。反转录使用宝生物工程有限公司生产的试剂盒，具体操作参照试剂盒说明书。cDNA 用于实时定量 PCR，采用 6 μL 反应体系，分别为：3 μL SYBR Premix Ex Taq Ⅱ，0.24 μL 上游引物，0.24 μL 下游引物，0.12 μL ROX Reference Dye，1.8 μL 蒸馏水，0.6 μL cDNA。根据所测基因序列，在 GenBank 中查找所测

基因全序列，采用 Primer 3 软件设计引物。基因和引物信息见表 2。引物由生工（上海）生物工程股份有限公司合成。实时定量 PCR 采用 ABI 7900HT 荧光定量 PCR 仪（美国）。目的基因的表达量为目的基因与内参基因[β 肌动蛋白（β-actin）]基因表达量的比值，同时设定对照组目的基因表达量为 1.0。

表 2　基因和引物信息

Table 2　Genes and primer information

基因 Genes	引物序列 Primer sequences（5′-3′）	产物大小 Product size/bp	GenBank 登录号 GenBank accession No.
维生素 D 受体 *VDR*	F:TTGCCAAACACCTCAAGCACAA G R:TGCTCTACGCCAAGATGATCCAGA	139	AJ606306
维生素 D 25-羟化酶 *CYP2R*1	F:GTACGGCGAGATCTTCAGCTTA R:TGAATA AGGCAGGCATGGTCT	131	KP687259.1
维生素 D 1α-羟化酶 *CYP27B*1	F:GGGGAATGTGACAGAGTTGCTA R:GCCGAGAGAGTTCATAGAGAGC	83	NM_213995.1
维生素 D 24-羟化酶 *CYP24A*1	F:GTAATCCCCACGTG AACAAAA R:ATATTCCTCAAATCCTCCGCCC	91	NM_214075.2
芳香化酶 *CYP*19	F:CTGCTGCTCATTGGCTTACTTC R:TTCCCAGAAAATAGCCAGGACC	82	U92246.1
β 肌动蛋白 β-actin	F:CGGGACCTGACCGACTACCT R: GCCGTGATCTCCTTCTGC	66	DQ845171.1

1.5　数据处理与分析

数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行独立样本 *t* 检验，以 $P<0.05$ 为差异显著标准,$0.05\leq P<0.10$ 为有差异显著的趋势）。

2　结　果

2.1　饲粮维生素 D 添加形式对睾丸体积的影响

由表 3 可知，不同饲粮维生素 D 添加形式对第 1 天、第 56 天、第 112 天公猪的睾丸体积均无显著影响（$P>0.05$）。

表 3　饲粮维生素 D 添加形式对睾丸体积的影响

Table 3　Effects of dietary vitamin D forms on testicular volume of boars　　cm^3

项目 Items	组别 Groups		SEM	*P* 值 *P*-value
	VD_3	25-OHD_3		
第 1 天 Day 1	1 302	1 311	186.30	0.962
第 56 天 Day 56	1 586	1 568	206.10	0.933
第 112 天 Day 112	1 674	1 646	217.30	0.900

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（P<0.05），相同或无字母表示差异不显著（P>0.05）。下表同。

Values in the same row with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference (P>0.05). The same as below.

2.2 饲粮维生素 D 添加形式对公猪性欲表现和精液品质的影响

由表 4 可知，试验 1～8 周各组公猪的性欲表现无显著性差异（P>0.05）。1~8 周 25-OHD$_3$ 组部分精液品质指标高于 VD$_3$ 组，其中精子前向性出现趋势性增加（P=0.082），但 2 组公猪精液品质指标均无显著差异（P>0.05）。

表 4 饲粮维生素 D 添加形式对公猪性欲表现和精液品质的影响（1～8 周）

Table 4 Effects of dietary vitamin D forms on libido and semen quality of boars (1 to 8 weeks)

项目 Items	组别 Groups		SEM	P 值 P-value
	VD$_3$	25-OHD$_3$		
性欲表现 Libido				
反应时间 Reaction time/s	209.9	239.9	17.53	0.109
持续时间 Persistent period/s	451.6	474.7	91.93	0.805
精液品质 Semen quality				
胶体重量 Gel weight/g	56.02	48.99	6.51	0.299
精液体积 Semen volume/mL	324.6	314.4	23.58	0.673
精子密度 Sperm density/($\times10^8$ 个/mL)	2.24	2.35	0.23	0.672
有效精子数 Effective number of sperm/$\times10^8$ 个	545.9	566.2	29.73	0.593
精子存活率 Sperm viability/%	91.31	91.22	0.54	0.867
精子活力 Sperm motility/%	81.00	81.57	1.51	0.708
畸形率 Deformity ratio/%	11.30	10.21	0.63	0.246
顶体完整率 Acrosomal integrity/%	63.46	63.34	0.88	0.897
质膜完整率 Plasma membrane integrity/%	97.88	97.96	0.09	0.165
路径速度 VAP/(μm/s)	42.56	43.26	4.08	0.867
直线速度 VSL/(m/s)	39.03	40.80	4.28	0.685
曲线速度 VCL/(μm/s)	55.76	58.88	6.42	0.634
侧摆幅度 ALH	17.16	17.35	2.14	0.934
鞭打频率 BCF/Hz	14.81	16.29	2.00	0.470
线性度 LIN	0.68	0.67	0.02	0.705
移动角度 MAD/μm	24.67	29.20	4.97	0.379
前向性 STR	0.91	0.95	0.02	0.082

由表 5 可知，试验 9～16 周 25-OHD$_3$ 组精子活力、每次射精的有效精子数、顶体完整率和精子的直线速度显著高于 VD$_3$ 组（P<0.05），而畸形率显著低于 VD$_3$ 组（P<0.05）。25-OHD$_3$ 组精子运动路径速度（P=0.089）和前向性（P=0.074）有高于 VD$_3$ 组的趋势，但 2 组其他精液品质和公猪性欲表现差异不显著（P>0.05）。

表 5 饲粮维生素 D 添加形式对公猪性欲表现和精液品质的影响（9～16 周）

Table 5 Effects of dietary vitamin D forms on libido and semen quality of boars (9 to 16 weeks)

项目 Items	组别 Groups VD3	组别 Groups 25-OHD3	SEM	*P* 值 *P*-value
性欲表现 Libido				
反应时间 Reaction time/s	232.8	254.1	23.71	0.384
持续时间 Persistent period/s	444.3	451.8	73.39	0.920
精液品质 Semen quality				
胶体重量 Gel weight/g	55.24	52.40	4.70	0.556
精液体积 Semen volume/mL	310.3	307.8	27.11	0.928
精子密度 Sperm density/(×10^8 个/mL)	2.78	2.99	0.30	0.512
有效精子数 Effective number of sperm/×10^8 个	666.3^a	732.2^b	36.23	0.047
精子存活率 Sperm viability/%	91.75	92.30	0.49	0.282
精子活力 Sperm motility/%	80.98^a	83.96^b	0.82	0.041
畸形率 Deformity ratio/%	10.40^a	9.02^b	0.42	0.039
顶体完整率 Acrosomal integrity/%	64.90^a	67.75^b	0.95	0.046
质膜完整率 Plasma membrane integrity/%	98.05	98.41	0.05	0.181
路径速度 VAP/(μm/s)	41.75	45.37	1.97	0.089
直线速度 VSL/(μm/s)	36.42^a	41.31^b	1.96	0.027
曲线速度 VCL/(μm/s)	57.94	61.87	4.31	0.378
侧摆幅度 ALH	16.89	17.87	1.56	0.540
鞭打频率 BCF/Hz	21.39	23.27	1.77	0.309
线性度 LIN	0.64	0.67	0.02	0.163
移动角度 MAD/μm	40.72	42.63	3.43	0.587
前向性 STR	0.88	0.90	0.01	0.074

由表 6 可知，全期 1~16 周 25-OHD$_3$ 组公猪精子活力和每次射精的有效精子数显著高于 VD$_3$ 组（P<0.05），而 25-OHD$_3$ 组公猪精子畸形率显著低于 VD$_3$ 组（P<0.05）。25-OHD$_3$ 组精子前向性有增加的趋势（P=0.091），而饲粮维生素 D 添加形式对试验全期公猪的性欲表现和其他精液品质均无显著性影响（P>0.05）。

表 6 饲粮维生素 D 添加形式对公猪性欲表现和精液品质的影响（1～16 周）

Table 6 Effects of dietary vitamin D forms on libido and semen quality of boars (1 to 16 weeks)

项目 Items	组别 Groups VD3	组别 Groups 25-OHD3	SEM	*P* 值 *P*-value
性欲表现 Libido				
反应时间 Reaction time/s	218.4	246.2	19.19	0.169
持续时间 Persistent period/s	449.8	464.8	87.29	0.866
精液品质 Semen quality				
胶体重量 Gel weight/g	54.43	48.47	5.83	0.327
精液体积 Semen volume/mL	319.5	311.4	20.82	0.706
精子密度 Sperm density/(×10^8 个/mL)	2.51	2.64	0.24	0.584
有效精子数 Effective number of sperm/×10^8 个	603.7^a	659.4^b	28.33	0.050
精子存活率 Sperm viability/%	91.71	91.85	0.58	0.809

精子活力 Sperm motility/%	80.74[a]	83.11[b]	1.13	0.048
畸形率 Deformity ratio/%	10.76[a]	9.46[b]	0.44	0.048
顶体完整率 Acrosomal integrity/%	64.33	64.92	0.62	0.360
质膜完整率 Plasma membrane integrity/%	97.95	98.15	0.05	0.131
路径速度 VAP/(μm/s)	41.52	44.49	3.18	0.368
直线速度 VSL/(μm/s)	36.95	40.90	3.15	0.232
曲线速度 VCL/(μm/s)	56.34	60.61	5.29	0.435
侧摆幅度 ALH	16.73	17.68	1.89	0.626
鞭打频率 BCF/Hz	17.53	19.01	1.56	0.363
线性度 LIN	0.66	0.67	0.01	0.317
移动角度 MAD/μm	31.50	34.29	3.78	0.472
前向性 STR	0.89	0.91	0.01	0.091

2.3 饲粮维生素 D 添加形式对公猪血浆及精清 25-OHD$_3$ 含量的影响

由表 7 可知，血浆 25-OHD$_3$ 含量在试验第 1 天、第 56 天和第 112 天差异均不显著（P>0.05）。精清中，试验第 56 天、第 112 天 25-OHD$_3$ 组 25-OHD$_3$ 含量显著高于 VD$_3$ 组（P<0.05）；而第 1 天时精清 25-OHD$_3$ 含量 2 组间未出现显著差异（P>0.05）。

表 7 饲粮维生素 D 添加形式对公猪血浆及精清 25-OHD$_3$ 含量的影响

Table 7 Effects of dietary vitamin D forms on 25-OHD$_3$ content of blood plasma and seminal plasma of boars

ng/mL

项目 Items	组别 Groups		SEM	*P* 值 *P*-value
	VD$_3$	25-OHD$_3$		
血浆 Blood plasma				
第 1 天 Day 1	64.73	63.39	5.88	0.825
第 56 天 Day 56	62.83	73.45	3.37	0.147
第 112 天 Day 112	72.40	77.28	3.68	0.163
精清 Seminal plasma				
第 1 天 Day 1	123.9	118.3	4.65	0.625
第 56 天 Day 56	136.9[a]	148.3[b]	3.65	0.049
第 112 天 Day 112	142.7[a]	152.7[b]	2.95	0.043

2.4 饲粮维生素 D 添加形式对公猪血浆生化指标的影响

由表 8 可知，第 1 天和第 56 天 2 组血浆 Ca^{2+}、P、睾酮、雌二醇含量和芳香化酶活性均无显著性差异（P>0.05），其中在第 56 天，25-OHD$_3$ 组血浆雌二醇含量与 VD$_3$ 组相比有升高的趋势（P=0.056）。试验第 112 天，25-OHD$_3$ 组血浆雌二醇、Ca^{2+}含量和芳香化酶活性显著高于 VD$_3$ 组（P<0.05）。

表 8 饲粮维生素 D 添加形式对公猪血浆生化指标的影响

Table 8 Effects of dietary vitamin D forms on plasma biochemical indexes of boars

项目 Items	组别 Groups		SEM	P 值 P-value
	VD_3	25-OHD_3		
钙离子 Ca^{2+}/(mmol/L)				
第 1 天 Day 1	1.16	1.19	0.05	0.566
第 56 天 Day 56	1.15	1.18	0.05	0.221
第 112 天 Day 112	1.19^{a}	1.46^{b}	0.03	0.038
磷 P/(mmol/L)				
第 1 天 Day 1	1.43	1.44	0.13	0.929
第 56 天 Day 56	1.58	1.58	0.10	0.974
第 112 天 Day 112	1.58	1.60	0.08	0.583
睾酮 T/(ng/mL)				
第 1 天 Day 1	5.25	5.48	0.72	0.766
第 56 天 Day 56	6.45	6.96	0.83	0.589
第 112 天 Day 112	7.02	7.66	1.28	0.627
雌二醇 E_2/(pg/mL)				
第 1 天 Day 1	14.29	13.57	2.64	0.792
第 56 天 Day 56	14.32	16.32	0.91	0.056
第 112 天 Day 112	16.81^{a}	19.93^{b}	1.17	0.046
芳香化酶 Aromatase/(U/mL)				
第 1 天 Day 1	19.65	18.62	5.37	0.853
第 56 天 Day 56	18.40	20.10	3.51	0.639
第 112 天 Day 112	19.38^{a}	27.24^{b}	3.32	0.035

2.5 饲粮维生素 D 添加形式对公猪精清生化指标的影响

由表 9 可知，试验第 1 天，2 组精浆 Ca^{2+}、P、果糖含量和 ACP 活性之间没有显著差异（P<0.05）。试验第 56 天，25-OHD_3 组精清果糖含量显著高于 VD_3 组（P<0.05）；而 2 组精清 Ca^{2+}、P 含量和 ACP 活性差异不显著（P>0.05）。试验第 112 天，25-OHD_3 组精清 Ca^{2+}、果糖含量和 ACP 活性显著高于 VD_3 组（P<0.05），2 组精清 P 含量差异不显著（P>0.05）。

表 9　饲粮维生素 D 添加形式对公猪精清生化指标的影响

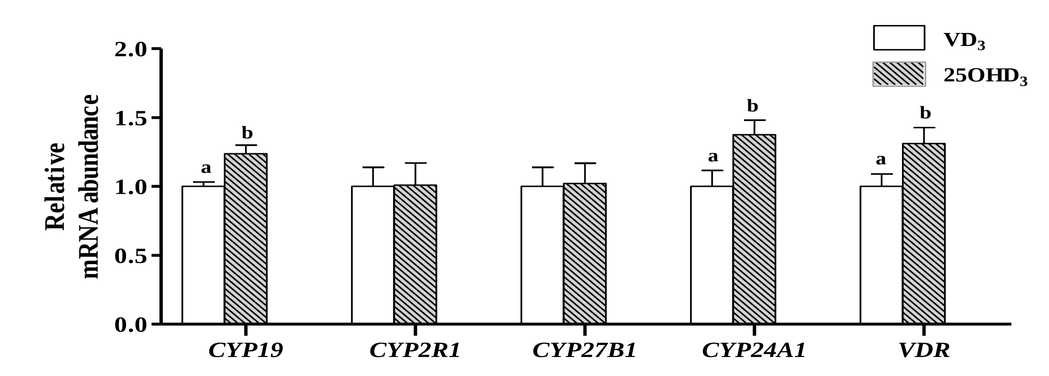
Table 9　Effects of dietary vitamin D forms on seminal biochemical indexes of boars

项目 Items	组别 Groups		SEM	P 值 P-value
	VD_3	25-OHD_3		
钙离子 Ca^{2+}/(mmol/L)				
第 1 天 Day 1	0.55	0.57	0.07	0.846
第 56 天 Day 56	0.59	0.60	0.09	0.923
第 112 天 Day 112	0.62^{a}	0.72^{b}	0.04	0.050
磷 P/(mmol/L)				
第 1 天 Day 1	0.22	0.24	0.08	0.825
第 56 天 Day 56	0.25	0.25	0.06	0.918
第 112 天 Day 112	0.25	0.25	0.04	0.867
酸性磷酸酶 ACP/(U/dL)				

第 1 天 Day 1	112.5	116.7	8.65	0.712
第 56 天 Day 56	126.2	141.2	7.61	0.077
第 112 天 Day 112	156.6[a]	176.9[b]	9.79	0.047
果糖 Fructose/(mg/mL)				
第 1 天 Day 1	0.55	0.56	0.03	0.894
第 56 天 Day 56	0.57[a]	0.64[b]	0.02	0.011
第 112 天 Day 112	0.59[a]	0.68[b]	0.02	0.004

2.6 饲粮添加维生素 D 形式对公猪精子基因表达量的影响

由图 1 可知，25-OHD$_3$ 组精子 *CYP19*、*CYP24A1* 和 *VDR* 的基因表达量显著高于 VD$_3$ 组（*P*<0.05），而 2 组 *CYP2R1* 和 *CYP27B1* 的基因表达量差异不显著（*P*>0.05）。



数据柱形标注不同小写字母不同表示差异显著（*P*<0.05）。

Data columns with different small letters mean significant difference （*P*<0.05）.

图 1 饲粮维生素 D 添加形式对公猪精子基因表达量的影响

Fig.1 Effects of dietary vitamin D forms on sperm gene expression levels of boars

3 讨 论

在老鼠等动物中的研究表明,维生素 D 可能影响精液质量和动物生育能力[7,14]。本研究表明，不同饲粮维生素 D 添加形式对公猪各试验阶段的睾丸体积、精子密度与数量、性欲均无显著性影响。公猪每次射精的精子都是经过在睾丸中产生和附睾中成熟 2 个阶段。在公猪睾丸中，精子由生殖细胞形成并在产生过程中受支持细胞影响，研究表明，每个物种睾丸支持细胞对生殖细胞的承载能力在一定范围内是相对稳定的[15-16]，而每个睾丸支持细胞的总数在睾丸发育期间已经确定，因此本试验 2 组公猪精子密度和睾丸体积无差异。

本研究首次比较得出了在相同维生素 D 水平下，以 25-OHD$_3$ 形式添加到饲粮后可使公猪精子活力、直线运动速度和每次射精的有效精子数显著高于 VD$_3$ 形式，公猪精子畸形率显著低于 VD$_3$ 组，这与 Hammoud 等[17]和 Jensen 等[18]的研究结果基本一致。Hammoud 等[17]

在对 170 名健康男性血液维生素 D 含量分析后发现，血液 25-OHD$_3$ 含量在 25~50 nmol/L 时，精子活力高而畸形率低。此外，Jensen 等[18]体外研究表明，1,25-二羟基维生素 D$_3$[1,25-(OH)$_2$D$_3$]使细胞内 Ca^{2+}含量增加，从而使人的精子能动性增加，诱导成熟精子的顶体反应。

本研究表明，相比于 50 μg/kg VD$_3$，公猪接受 50 μg/kg 25-OHD$_3$ 饲粮血浆 25-OHD$_3$ 的含量数值上增加，但 2 组间差异不显著，这与 Bar 等[19]和 Weber 等[20]研究结果不一致。本研究检测了公猪精清的 25-OHD$_3$ 含量，结果表明 25-OHD$_3$ 组的公猪精清 25-OHD$_3$ 含量显著高于 VD$_3$ 组。这就暗示饲粮中 25-OHD$_3$ 能够进入血液循环，进而更多地被生殖组织利用。Bar 等[19]在肉鸡上的研究表明，与 VD$_3$ 相比，饲粮中添加的 25-OHD$_3$ 在肠道更易被吸收利用。此外，Weber 等[20]给母猪分别饲喂添加 200 IU/kg VD$_3$、2 000 IU/kgVD$_3$ 和 50 μg/kg 25-OHD$_3$ 的饲粮发现，饲喂 50 μg/kg 25-OHD$_3$ 饲粮的母猪血液中 25-OHD$_3$ 含量显著高于其他 2 组，这就进一步证实了饲粮中添加的 25-OHD$_3$ 更容易被胃肠吸收利用。

进一步研究发现，与添加 VD$_3$ 相比，饲粮添加 25-OHD$_3$ 增加了血浆中雌二醇和 Ca^{2+}的含量及芳香化酶的活性，同时精清中果糖、Ca^{2+}含量和 ACP 活性也显著升高；而血浆中睾酮、P 和精清中 P 无差异。这与 Jensen 等[18]的研究结果基本一致，说明饲粮添加 25-OHD$_3$ 能被更有效利用转化为活性形式的 1,25-(OH)$_2$D$_3$，从而提高血清中 Ca^{2+}含量。芳香化酶是睾酮转化为雌二醇的关键酶，活性形式的 1,25-(OH)$_2$D$_3$ 绑定到 *CYP19* 基因的启动子维生素 D 反应元件（VDRE），通过抑制乳腺或者诱导骨骼 *CYP19* 基因转录增加了芳香化酶的活性[21-22]，芳香化酶活性**的**增加会促进睾酮转化为雌二醇。这说明睾酮被充分利用，25-OHD$_3$ 组血浆中睾酮含量未出现显著增加，同时雌二醇含量显著增加。

研究表明，*VDR* 和维生素 D 相关代谢酶基因 *CYP2R1*、*CYP27B1*、*CYP24A1* 在公猪睾丸支持细胞、生殖细胞、间质细胞、精子和雄性生殖组织上皮细胞内层都有表达[23-26]。本研究表明，25-OHD$_3$ 组精子中 *VDR*、*CYP24A1* 和 *CYP19* 的基因表达量显著增加。Aquila 等[27]等研究表明，1,25-(OH)$_2$D$_3$ 在睾丸中有高度亲和力对性腺 *VDR* 和 *CYP24A1* 基因的表达有促进作用。因此说明饲粮添加 25-OHD$_3$ 能更有效地被吸收转化为维生素 D 的生物活性形式 1,25-(OH)$_2$D$_3$ 作用于精子和性腺组织。饲粮添加 25-OHD$_3$ 组精子 *CYP19* 基因的表达量增加，这与试验中增加的芳香化酶活性相对应，说明饲粮添加 25-OHD$_3$ 能更有效促进 *CYP19* 基因的表达。

4 结 论

与同等水平 VD_3 相比，种公猪饲粮中添加 25-OHD_3 能更有效增加血浆维生素 D 含量，从而改善精子的形态和运动能力，提高公猪的繁殖性能。

参考文献：

[1] SMITAL J,WOLF J,DE SOUSA L L.Estimation of genetic parameters of semen characteristics and reproductive traits in AI boars[J].Animal Reproduction Science,2005,86(1/2):119–130.

[2] HUANG Y H,LO L L,LIU S H,et al.Age-related changes in semen quality characteristics and expectations of reproductive longevity in Duroc boars[J].Animal Science Journal,2010,81(4):432–437.

[3] CLARK S G,SCHAEFFER D J,ALTHOUSE G C.B-mode ultrasonographic evaluation of paired testicular diameter of mature boars in relation to average total sperm numbers[J].Theriogenology,2003,60(6):1011–1023.

[4] YESTE M,SANCHO S,BRIZ M,et al.A diet supplemented with *L*-carnitine improves the sperm quality of Piétrain but not of Duroc and Large White boars when photoperiod and temperature increase[J].Theriogenology,2010,73(5):577–586.

[5] CASAS I,SANCHO S,BALLESTER J,et al.The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability[J].Theriogenology,2010,74(6):940–950.

[6] KUNAVONGKRIT A,SURIYASOMBOON A,LUNDEHEIM N,et al.Management and sperm production of boars under differing environmental conditions[J].Theriogenology,2005,63(2):657–667.

[7] KWIECINSKI G G,PETRIE G I,DELUCA H F.Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat[J].The Journal of Nutrition,1989,119(5):741–744.

[8] 杨宏伟.维生素 D_3 在动物生产中研究进展[J] .河南畜牧兽医,2016(4):16–18.

[9] COFFEY J D,HINES E A,STARKEY J D,et al.Feeding 25-hydroxycholecalciferol improves gilt reproductive performance and fetal vitamin D status[J].Journal of Animal Science,2012,90(11):3783–3788.

[10] HINES E A,COFFEY J D,STARKEY C W,et al.Improvement of maternal vitamin D status with 25-hydroxycholecalciferol positively impacts porcine fetal skeletal muscle development and myoblast activity[J].Journal of Animal Science,2013,91(9):4116–4122.

[11] ZHOU H,CHEN Y L,ZHOU Y,et al.Effects of 25-hydroxycholecalciferol supplementation in maternal diets on milk quality and serum bone status markers of sows and bone quality of piglets[J].Animal Science Journal,2017,88(3):476–483.

[12] AUDET I,LAFOREST J P,MARTINEAU G P,et al.Effect of vitamin supplements on some aspects of performance,vitamin status,and semen quality in boars[J].Journal of Animal Science,2004,82(2):626–633.

[13] WHO.WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction[M].Cambridge:Cambridge University Press,1999.

[14] HIRAI T,TSUJIMUAR A,UEDA T,et al.Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D on testicular morphology and gene expression in experimental cryptorchid mouse:testis specific cDNA microarray analysis and potential implication in male infertility[J].The Journal of Urology,2009,181(3):1487–1492.

[15] WING T Y,CHRISTENSEN A K.Morphometric studies on rat seminiferous tubules[J].American Journal of Anatomy,1982,165(1):13–25.

[16] RUSSELL L D,PETERSON R N.Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals[J].Journal of Reproduction and Fertility,1984,70(2):635–641.

[17] HAMMOUD A O,MEIKLE A W,PETERSON C M,et al.Association of 25-hydroxy-vitamin D levels with semen and hormonal parameters[J].Asian Journal of Andrology,2012,14(6):855–859.

[18] JENSEN M B,BJERRUM P J,JESSEN T E,et al.Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa[J].Human Reproduction,2011,26(6):1307–1317.

[19] BAR A,RAZAPHKOVSKY V,VAX E,et al.Performance and bone development in broiler chickens given 25-hydroxycholecalciferol[J].British Poultry Science,2003,44(2):224–233.

[20] WEBER G M,WITSCHI A K M,WENK C,et al.Effects of dietary 25-hydroxycholecalciferol and cholecalciferol on blood and vitamin D and mineral status,bone turnover,milk composition and reproductive performance of sows[J].Journal of Animal Science,2014,92(11):899–909.

[21] VERSTUYF A,CARMELIET G,BOUILLON R,et al.Vitamin D:a pleiotropic hormone [J].Kidney International,2010,78(2):140–145.

[22] ERBEN R G,SOEGIARTO D W,WEBER K,et al.Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D[J].Molecular Endocrinology,2002,16(7):1524–1537.

[23] BOUILLON R,CARMELIET G,VERLINDEN L,et al.Vitamin D and human health:lessons from vitamin D receptor null mice[J].Endocrine Reviews,2008,29(6):726–776.

[24] JOHNSON J A,GRANDE J P,ROCHE P C,et al.Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D_3 receptor in rat reproductive tissues[J].Histochemistry and Cell Biology,1996,105(1):7–15.

[25] CORBETT S T,HILL O,NANGIA A K.Vitamin D receptor found in human sperm[J].Urology,2006,68(6):1345–1349.

[26] MAHMOUDI A R,ZARNANI A H,JEDDI-TEHRANI M,et al.Distribution of vitamin D receptor and 1α-hydroxylase in male mouse reproductive tract[J].Reproductive Sciences,2013,20(4):426–436.

[27] AQUILA S,GUIDO C,MIDDEA E,et al.Human male gamete endocrinology:1alpha,25-dihydroxyvitamin D_3 (1,25$(OH)_2D_3$) regulates different aspects of human sperm biology and metabolism[J].Reproductive Biology and Endocrinology,2009,7:140.

Effects of Dietary Vitamin D Forms on Reproductive Performance of Boars

WEI Dongqin[1] DONG Hongjun[1*] LYU Gang[2] WU De[1] XU Shengyu[1] FANG Zhengfeng[1] CHE Lianqiang[1] FENG Bin[1] LI Jian[1] LIN Yan[1*]

*

（1. *Institute of Animal Nutrition*, *Sichuan Agricultural University*, *Chengdu* 611130, *China*; 2. *Tongwei Group Co.*, *Ltd.*, *Chengdu* 610041, *China*）

Abstract: This study was conducted to investigate the effects of dietary vitamin D supplementation forms on reproductive performance of boars. Sixteen Yorkshire boars with eighteen months of age were randomly allocated to one of two groups, vitamin D_3 (VD_3) and 25-hydroxycholecalciferol (25-OHD_3) at 50 μg/kg were supplemented in basal diet in different groups, respectively. Each group had 8 replicates with 1 boar per replicate. The trial lasted for 16 weeks. The results showed that compared with VD_3 group: sperm motility, effective sperm number per ejaculation in 25-OHD_3 group were significantly increase in 1 to 16 weeks (P<0.05), while deformity ratio was significantly decreased (P<0.05); in diets of boars plasma calcium ion (Ca^{2+}) content, estradiol content and aromatase activity in 25-OHD_3 group were significantly increased at day 112 (P<0.05), and seminal plasma 25-OHD_3 content, Ca^{2+} content, fructose content and acid phosphatase activity in 25-OHD_3 group were significantly increased (P<0.05); expression levels of aromatase, vitamin D 25-hydroxylase，vitamin D 24-hydroxylase and vitamin D receptor genes in 25-OHD_3 group were significantly increased (P<0.05). In conclusion, compared with the same level of VD_3, supplementation of 25-OHD_3 in diet is conducive to increase plasma vitamin D content, so as to improve sperm morphology and athletic ability, and then improve reproductive performance of boars.

Key words: vitamin D_3; 25-hydroxycholecalciferol; boar; reproductive performance